

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agronomi Fakultas Pertanian, Laboratorium Biologi, Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang, dan Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan selama 1 bulan.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya sentrifuge, tube sentrifuge, rotary shaker, LAF (Laminar Air Flow), jarum ose, gelas ukur, erlenmeyer, petri dish, scalpel blade, timbangan analitik, mortal martil, refraktometer, penetrometer, pipet tetes, pipet skala, karet hisap, handsprayer, saringan, spatula, sarung tangan, ember, keranjang, kotak kardus, gunting, kalkulator, kamera, label, pisau, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya pepaya Callina, ekstrak kitinase dari *Trichoderma koningii*, media PDA, reagen pp 1%, Iodin, kitin 0,5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CaCl}_2$ , *Thiabendazole* 1%, dan aquades steril.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap ( RAL ) sederhana. Faktor perlakuan yang digunakan yaitu pelapisan ekstrak kitinase *Trichoderma koningii* (T) yang terdiri dari berbagai konsentrasi : T0 : tanpa perlakuan (kontrol -), T1 : ekstrak kitinase 30 % v/v, T2 : ekstrak

kitinase 50 % v/v, T3 : ekstrak kitinase 70 % v/v, T4 : Thiabendazole (kontrol +).

Terdapat lima perlakuan dan diulang empat kali.

### **3.4 Tahap Penelitian**

#### **3.4.1 Pemilihan Buah Pepaya**

Buah pepaya Callina yang siap panen dibeli dari petani buah pepaya CV Negeri Hijau Indonesia yang ada di Tuban. Buah pepaya Callina yang digunakan dipilih yang memiliki bentuk, ukuran, bebas penyakit atau sebab lain serta umur yang seragam, dan memilih buah yang masak fisiologis dengan bobot rata-rata 1 Kg sesuai dengan Lampiran 47 (b). Tingkat kematangan buah pepaya Callina yang dipilih adalah buah dengan indeks skala warna kulit no. 2 menurut Taris (2014).

#### **3.4.2 Pencucian Buah**

Buah pepaya yang sudah melalui tahapan sortir dicuci menggunakan air mengalir agar menghilangkan kotoran yang menempel pada kulit buah pepaya sesuai dengan Lampiran 47 (g). Kemudian buah ditiriskan dan dikeringanginkan.

#### **3.4.3 Pembuatan Kultur *Trichoderma koningii***

Isolat *Trichoderma koningii* didapatkan dari Bidang Hama Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Isolat diperbanyak dengan teknik pemurnian pada media PDA secara aseptik dalam LAF di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang sesuai dengan Lampiran 47 (d).

#### **3.4.4 Pembuatan Ekstrak Kitinase dari *Trichoderma koningii***

- a) Menginokulasi tiga potong agar berisi kultur jamur *Trichoderma koningii* dalam media kitin cair yang mengandung 125 ml koloidal kitin 0,5%, 0,65 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g  $\text{NaCl}$ , 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan 0,005 g  $\text{CaCl}_2$ .

- b) Kultur diinkubasi selama 5 hari dengan rotary shaker (120 rpm) pada suhu ruang.
- c) Menginokulasi 10 ml kultur *Trichoderma koningii* ke dalam 1.000 ml media kitin cair dengan teknik aseptik.
- d) Kultur diinkubasi selama 5 hari dengan rotary shaker (120 rpm) pada suhu ruang.
- e) Mensentrifus kultur dengan kecepatan 12.800x g selama 5 menit pada suhu 4°C menggunakan ultrasentrifus di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang sesuai Lampiran 47 (e).
- f) Mengambil 200 ml supernatant sebagai ekstrak enzim kitinase (Sassa dkk., 2009) sesuai dengan Lampiran 47 (f).

Diperlukan ekstrak kitinase sebanyak 4,5 L sehingga tahap pembuatan ekstrak dilakukan 23 kali.

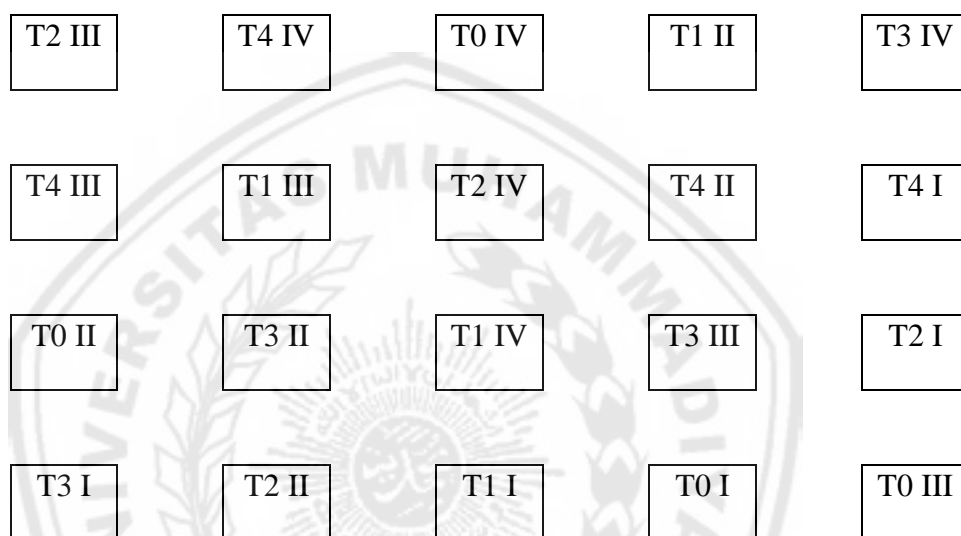
#### **3.4.5 Pelapisan Ekstrak Kitinase**

Buah pepaya dilapisi dengan ekstrak kitinase yang dihomogenkan dengan aquades steril 1 L yang mengandung minyak tween 2% v/v sesuai perlakuan : (T1) konsentrasi 30% v/v, (T2) konsentrasi 50% v/v, dan (T3) konsentrasi 70% v/v. Pelapisan dilakukan dengan cara penyemprotan ekstrak kitinase menggunakan handsprayer ke kulit buah pepaya Callina secara merata. Penyemprotan dilakukan secara berkala setiap 5 hari sekali sesuai dengan Lampiran 47 (i).

### 3.4.6 Penirisan dan Pengemasan

Penirisan dilakukan selama 1 menit, kemudian meletakkan buah pepaya ke dalam kotak kardus yang sudah dilubangi sisi - sisinya. Jumlah buah pepaya dalam satu kotak kardus adalah 5 buah sesuai Lampiran 47 (h).

### 3.4.7 Denah Penelitian



**Gambar 6. Denah Penelitian**

Keterangan : Pelapisan kitinase dari *Trichoderma koningii* terdiri dari T0 : tanpa perlakuan (kontrol -), T1 : ekstrak kitinase 30% v/v, T2 : ekstrak kitinase 50% v/v, T3 : ekstrak kitinase 70% v/v, T4 : Thiabendazole (kontrol +). Terdapat 5 perlakuan dan diulang empat kali.

### 3.4.8 Pengamatan

Selang waktu pengamatan bervariasi mulai dari 2 dan 3 hari sekali sampai dengan 15 hari penyimpanan pengaplikasian ekstrak kitinase, dengan parameter pengamatan sebagai berikut :

#### 3.4.8.1 Susut Bobot

Pengukuran susut bobot dilakukan secara gravimetri, yaitu mengurangi selisih bobot sebelum perlakuan dengan sesudah perlakuan. Pengukuran dilakukan menggunakan timbangan analitik dan dihitung dengan rumus :

$$\frac{(\text{Bobot Awal} - \text{Bobot Akhir}) \times 100 \%}{\text{Bobot Awal}}$$

Pengamatan dilakukan saat awal sebelum diberi perlakuan maupun penyimpanan dan saat hari terakhir perlakuan (hari ke-15).

#### **3.4.8.2 Firmness (Tingkat Kekerasan Buah)**

Tingkat kekerasan buah pepaya diukur dengan alat penetrometer dengan menggunakan jarum *probe* di Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang. Permukaan buah pepaya akan ditusuk jarum *probe* yang kulitnya telah dikupas terlebih dahulu sesuai Lampiran 48 (h) dan (i), sehingga kedalaman lubang yang diakibatkan oleh penusukan tersebut akan menyatakan tingkat kekerasan buah pepaya. Pengamatan dilakukan 3 hari sekali sampai dengan 15 hari.

#### **3.4.8.3 Vitamin C**

Metode analisa vitamin C menggunakan metode Jacob (Sudarmadji dkk., 1984) :

- a) Menimbang sampel buah seberat 2 g
- b) Menghaluskan sampel buah dengan mortal martil
- c) Menambahkan aquades steril sebanyak 20 ml kemudian dihomogenkan dengan cara diaduk
- d) Menyaring air campuran sampel dengan aquades steril ke dalam gelas ukur sebanyak 2 ml
- e) Menambahkan reagen pp 1% ke dalam sampel sebanyak 3 tetes

- f) Melakukan titrasi sampel dengan Iodin 0,01 N sampai warna sampel berubah menjadi biru kehitaman dan menghitung jumlah Iodin (dalam ml) yang telah dititrasi.

Penghitungan kadar vitamin C dihitung dengan rumus :

$$\text{vitamin C} = \frac{\text{ml Iodin} \times 0,01 \text{ N} \times 0,88}{\text{berat sampel}} \times 1000$$

Pengujian vitamin C dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang dan dilakukan setiap 3 hari sekali sampai 15 hari pengamatan.

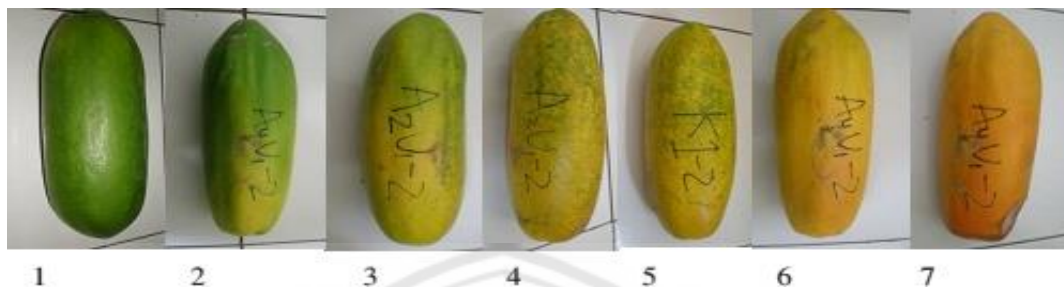
#### **3.4.8.4 TPT (Total Padatan Terlarut)**

Pengukuran kadar gula dalam buah diamati dengan menggunakan alat refraktometer di Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang. Cara yang digunakan adalah dengan mengambil sampel buah pepaya dari 3 bagian ; atas, tengah, dan bawah yang dihaluskan, kemudian meletakkan sampel yang sudah dihaluskan ke permukaan kaca refraktometer dan melihat nilai kadar gulanya dari hasil rerata 3 bagian sampel tersebut. Pengamatan dilakukan ketika awal perlakuan sampai dengan akhir penelitian (pengamatan dilakukan 3 hari sekali sampai 15 hari).

#### **3.4.8.5 Perubahan Warna**

Perubahan warna buah diamati dengan kasat mata di tempat penyimpanan buah. Pengamatan dilakukan 2 hari sekali dan menghitung berapa hari yang dibutuhkan buah untuk matang dengan ciri kulit buah menjadi kuning menyeluruh. Pada umumnya buah pepaya Callina membutuhkan waktu 7-9 hari

untuk matang menyeluruh dari indeks kematangan nomor 1 ke nomor 7 pada gambar 7.



**Gambar 7. Indeks kematangan buah pepaya Callina dengan skor warna.**

Keterangan: 1: Hijau, 2: Hijau sedikit kuning, 3: Hijau kekuningan, 4: Kuning lebih banyak dari pada hijau, 5: Kuning dengan ujung sedikit hijau, 6: Kuning penuh, 7: Kuning dengan sedikit bintik coklat (*over ripe*). (Sumber: Taris dkk., 2014)

#### 3.4.8.6 Persentase Keparahan Penyakit

Persentase keparahan penyakit pada buah diamati 2 hari sekali setelah perlakuan sampai dengan penelitian selesai. Dapat diukur dengan cara

$$\frac{\% \text{ Luas area yang terserang}}{\text{Jumlah buah yang diamati}}$$

#### 3.4.8.7 Intensitas Serangan Penyakit

Intensitas serangan penyakit pada buah diamati 2 hari sekali setelah perlakuan sampai dengan penelitian selesai. Pengukuran dinyatakan dalam :

$$\frac{\text{jumlah buah terserang}}{\text{jumlah buah yang diamati}} \times 100\%$$

#### 3.4.9 Analisa Data

Data dianalisa dengan menggunakan program SPSS dimana data dirata-rata kemudian dianalisa dengan uji F (anova). Penafsiran data dilakukan dengan

cara uji lanjut dengan BNJ pada taraf  $\alpha = 5\%$ . Hasil penelitian disimpulkan dari penafsiran data dan dokumentasi.

